

10/58204545

Rec'd PCT/A/ 19 JAN 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2004年7月1日 (01.07.2004)

PCT

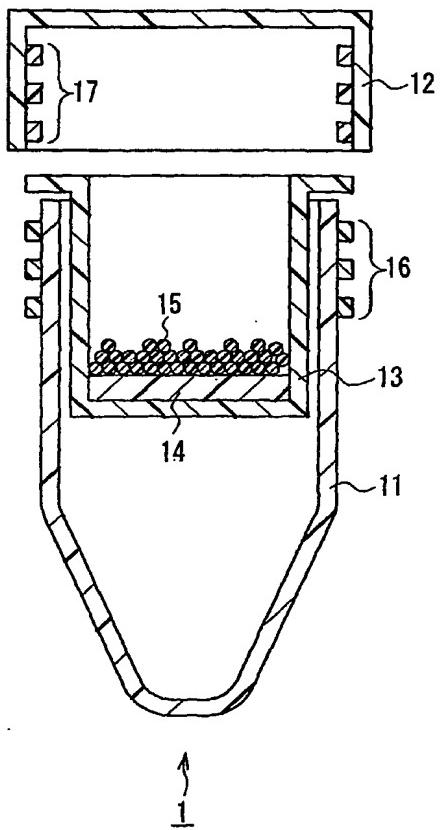
(10)国際公開番号
WO 2004/055170 A1

- (51)国際特許分類7: C12N 1/02, C12Q 1/68
- (21)国際出願番号: PCT/JP2003/015686
- (22)国際出願日: 2003年12月8日 (08.12.2003)
- (25)国際出願の言語: 日本語
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ:
特願2002-365818
2002年12月17日 (17.12.2002) JP
- (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町57番地 Kyoto (JP).
- (72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 岡本 雅司
- (OKAMOTO,Masashi) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 鎌田 達夫 (KAMATA,Tatsuo) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 和泉澤 裕司 (IZUMIZAWA,Yuji) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 村上 淳 (MURAKAMI,Atsushi) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).
- (74)代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒530-6026 大阪府 大阪市 北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).
- (81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,

(続葉有)

(54)Title: MICROORGANISM OR CELL COLLECTING METHOD, AND MICROORGANISM OR CELL COLLECTING IMPLEMENT USED FOR THE METHOD

(54)発明の名称: 微生物または細胞の収集方法およびそれに用いる微生物または細胞の収集用具



(57)Abstract: A method capable of easily collecting microorganisms or cells in a short time without using a special device, comprising the steps of preparing a centrifugal tube (1) in which the inside thereof is divided into upper and lower parts by a filter (14) and water absorbing resin particles (15) are disposed on the filter (14), pouring liquid specimen in the centrifugal tube (1) so that the liquid specimen touches the water absorbing resin particles (15) to absorb the liquid specimen by the resin particles so as to arrest microorganisms or cells on the surfaces of the particles, pouring collecting liquid into the centrifugal tube (1) to collect the microorganisms or cells with the collecting liquid and, by centrifugal separation, accumulating the collecting liquid at the bottom part of the centrifugal tube (1) through the filter (14).

(57)要約: 特殊な装置を用いることなく、簡単かつ短時間に微生物または細胞を収集できる方法を提供する。フィルター14で内部が上下に分けられ、かつ前記フィルター14上に吸水性樹脂粒子15が配置されている遠心チューブ1を準備し、この遠心チューブ1に液状試料を入れて前記吸水性樹脂粒子15に接触させることにより、液状試料を吸収させ、微生物または細胞を前記粒子表面で捕捉する。ついで前記回収液を前記遠心チューブ1に入れ、これで前記微生物または細胞を回収し、遠心分離により前記回収液を、前記フィルター14を通過させて前記遠心チューブ1の底部に溜める。

WO 2004/055170 A1



DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

微生物または細胞の収集方法およびそれに用いる微生物または細胞の収集用具

技術分野

5 本発明は、液状試料からの微生物または細胞の収集方法およびそれを用いた遺伝子の増幅若しくは検出方法に関する。

背景技術

結核は、今なお、世界的に重要な細菌性疾患であり、その治療方法のみならず診断方法は極めて重要である。結核の最終的確認は、培養法により行われるが、結核菌の増殖速度は極めて遅いため、培養法の前段階で実施される予備的診断方法の確立が望まれている。このような予備的診断方法として、注目されているのは、ポリメラーゼ チェーン リアクション（P C R 法）を適用した遺伝子検査法である。この方法は、結核菌の遺伝子に特異的なプライマーを用い、結核菌の遺伝子を増幅して検出することにより、結核菌の有無を判定する方法である。

前記 P C R 法を適用した予備的診断方法では、その前処理として結核菌を喀痰等の液状試料から菌を集菌する必要がある。従来の集菌方法は、例えば、つぎのようにして実施されていた（新 結核菌検査指針 2000 、p. 28-29、財団法人結核予防会発行）。まず、N-アセチル-L-システィン（NALC）と水酸化ナトリウム（NaOH）の溶液（NALC-NaOH溶液）を加えて粘性を除去した試料液を調製する。この試料液に対し、13000 g で 10 分間の遠心分離をすることにより、菌を沈殿させて集菌する

。しかしながら、この従来法での遠心分離による集菌では、その遠心条件が厳しく、煩雑な操作であり、しかも時間もかかり、高価な遠心分離機が必要である。また、この集菌に続く溶菌処理から遺伝子の増幅もしくは検出処理においても、従来の方法には、問題がある。従来の溶菌方法としては、例えば、有機溶媒等を用いた化学的方法、超音波や凍結・融解を繰り返す物理的方法等がある。しかし、結核菌は、その細胞壁の脂質含量が高く、従来の溶菌法では、遺伝子の抽出を十分に行うことができなかった。また、十分な抽出を行うためには、処理条件を過酷なものにする必要があり、それに伴い、特殊な装置や試薬を使用する必要があり、これに加え、処理時間の長期化や操作の煩雑化等の問題があった。このような集菌、溶菌および遺伝子の増幅等における問題は、結核菌を含む抗酸菌全体の問題でもあり、その他の菌およびウイルスにおいても起こり得る問題でもあり、白血球等の細胞においても同様の問題がある。

15

一方、最近問題になっている浴槽やプール等のレジオネラ菌や、河川、湖水若しくは海水などの大腸菌などの濃度を測定するためには、数リットル乃至数トン単位で検体試料を採取する必要があり、この中から微生物等を採取する必要がある。しかしながら、従来の手法では、効率良く採取することは困難であり、大量の検体から菌等を効率良く採取する技術の開発が求められていた。

発明の開示

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、特殊な装置を用いることなく簡単かつ短時間に微生物または細胞を収集できる方法の提供を第1の目的とし、特殊な装置や試薬を用いることなく簡単かつ短時間

に微生物または細胞を検出できる遺伝子の特異的な増幅若しくは検出方法の提供を第 2 の目的とする。

前記第 1 の目的を達成するために、本発明の微生物または細胞の収集
5 方法は、液状試料から微生物または細胞を収集する方法であって、前記液状試料を吸水性樹脂に接触させることにより、前記吸水性樹脂に前記液状試料の液相部を吸収させ、かつ前記吸水性樹脂表面部で微生物または細胞を捕獲して微生物または細胞を収集する方法である。

10 この方法によれば、前記吸水性樹脂により簡単かつ短時間に微生物または細胞を捕捉できるため、厳しい条件の遠心分離をする必要がない。また、検体試料の量に合せて前記吸水性樹脂の必要な大きさ若しくは量等を設定することができ、その結果、数リットル乃至数トンレベルの検体試料であっても、これを前記吸水性樹脂に接触させるだけで、目的とする菌等（例えば、レジオネラ菌、大腸菌など）を採取することができる。
15

つぎに、前記第 2 の目的を達成するために、本発明の遺伝子の検出若しくは増幅方法は、微生物または細胞の遺伝子を特異的に増幅若しくは検出する方法であって、前記本発明の収集方法により微生物または細胞を収集し、これに非イオン性界面活性剤を含む抽出試薬液を添加して加熱することにより微生物または細胞から遺伝子を抽出し、この遺伝子を特異的に増幅もしくは検出する方法である。
20

25 この方法は、前記本発明の収集方法と組み合わせた方法であり、非イオン界面活性剤を含む抽出試薬液を添加して加熱するだけで遺伝子の抽

出を行うことができ、その後の増幅等の操作に速やかに移ることができ
る。

図面の簡単な説明

5 図1は、本発明の収集方法に使用する遠心チューブの構造の一例を示
す断面図である。

図2の(a)～(d)は、本発明の収集方法の一例を示す工程図であ
る。

10 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明をさらに詳しく説明する。

本発明の微生物または細胞の収集方法において、前記吸水性樹脂に前
記液状試料を接触させた後、さらに、前記吸水性樹脂に回収液を接触さ
15 せることにより、前記吸水性樹脂表面に捕獲された微生物または細胞を
前記回収液中に回収することが好ましい。また、前記回収操作を複数回
繰り返し行い、回収液の添加量を減少させることで、回収液中の微生物
または細胞の濃度を高め、その結果、遠心分離等の後の工程をより効率
よく行うことができる。前記回収液は、特に制限されず、例えば、水、
20 蒸留水、イオン交換水、超純水、緩衝液等が使用できるが、好ましくは
、後述のように、微生物または細胞の抽出液を回収液として使用するこ
とである。

前記液状試料の添加量は、前記吸水性樹脂の吸水容量以下であること
25 が好ましく、また、前記液状試料の添加量に応じて、前記吸水性樹脂の
添加量を変化させ、前記液状試料の添加量が前記吸水性樹脂の吸水容量

以下となるように調整してもよい。また、前記回収液の添加量は、前記液状試料の液相部の吸収後における前記吸水性樹脂の吸水可能容量を超えた量であることが好ましい。前記吸水性樹脂は、例えば、自重の2～10000倍の吸水量、好ましくは、自重の5～5000倍の吸水量、
5 より好ましくは、自重の10～1000倍の吸水量を持つことが好ましい。大量の検体試料を処理する場合は、特に、吸水可能容量が大きい吸水性樹脂、例えば、自重の10000倍の吸水量を持つ吸水性樹脂を使用して処理を行うことが好ましい。前記吸水性樹脂は、特に制限されず、例えば、親水性官能基を有する親水性架橋重合体があげられる。前記
10 親水性官能基としては、アニオン性、ノニオン性、カチオン性等の親水性官能基があげられ、例えば、カルボキシル基、スルフォニル基、アミノ基等があげられる。吸水性樹脂の具体例としては、例えば、カルボキシメチルセルロースの架橋物、澱粉ーアクリルニトリルグラフト重合体の加水分解物、澱粉ーアクリル酸グラフト重合体の中和物、ポリアクリ
15 ル酸塩重合体の架橋物、ポリメタクリル酸塩重合体の架橋物、酢酸ビニルーアクリル酸エステル共重合体の鹼化物、アクリロニトリル重合体もしくはアクリルアミド共重合体の加水分解物またはこれらの架橋物、スルホン基含有重合体の架橋物、ポリエチレンオキサイドもしくはポリエチレンイミンの架橋物等があげられる。これらは、単独で使用してもよく、2種類以上で併用してもよい。この中で、好ましいのは、ポリアクリル酸塩、ポリアクリル酸の部分中和物の架橋物であり、より好ましいのはポリアクリル酸塩であり、その具体例としては、ポリアクリル酸ナトリウムがある。吸水性樹脂の形態は、特に制限されないが、下記のように、粒子形状が好ましい。

上下に分けられ、かつ前記フィルター上に吸水性樹脂粒子が配置されている遠心チューブを準備し、この遠心チューブに前記液状試料を入れて前記吸水性樹脂粒子に接触させ、ついで前記回収液を前記遠心チューブに入れて前記吸水性樹脂粒子に接触させ、遠心分離により前記回収液を
5 、前記フィルターを通過させて前記遠心チューブの底部に移動させることが好ましい。

前記方法に使用する遠心チューブは、フィルターで内部が上下に分けられ、かつ前記フィルター上に吸水性樹脂粒子が配置されている遠心チューブである。この一例を図1に示す。図示のように、この遠心チューブ1は、チューブ本体11と、キャップ12とを主要構成部材とする。チューブ本体11の外壁上部には、ネジ山16が形成され、キャップ12の内壁にはネジ溝17が形成され、これらにより、チューブ本体11とキャップ12とは螺合可能となっている。チューブ本体11の内部には、有底円筒状の支持体13が嵌め込まれており、前記支持体13の底にはフィルター14が配置され、この上に、吸水性樹脂粒子15が配置されている。前記フィルターは、特に制限されず、その孔径は、例えば、10nm～100μmの範囲であり、好ましくは0.1～20μmの範囲であり、より好ましくは0.1～10μmの範囲である。前記フィルターの材質は、特に制限されず、例えば、ポリフッ化ビニリデン、二トロセルロース、親水性ポリエーテルスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリスルホン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリマーアロイ、アセチルセルロース等があり、このなかで、ポリフッ化ビニリデン、ポリカーボネートが好ましく、より好ましくはポリカーボネートである。
10
15
20
25

この遠心チューブ 1 を使用した微生物または細胞の収集方法の一例を図 2 に示す。なお、図 2 において、図 1 と同一部分には同一符号を付している。すなわち、まず、図 2 (a) に示すように、チューブ本体 1 1 に、液状試料 2 を滴下する。すると、図 2 (b) に示すように、吸水性樹脂粒子 1 5 が前記液状試料 2 の液相部を吸水して膨張する。この時の液状試料 2 の滴下量は、吸水性樹脂粒子 1 5 全体の吸水量以下であり、微生物または細胞は、吸水性樹脂粒子 1 5 表面に付着している。そして、図 2 (b) に示すように、この吸水性樹脂粒子 1 5 に、さらに、回収液 3 を滴下する。上述のように、回収液として、抽出試薬液を使用することが好ましい。回収液 3 の滴下量は、前記液状試料 2 の液相部吸収後における吸水性樹脂粒子 1 5 全体の吸水可能容量を超えた量であるから、図 2 (c) に示すように、支持体 1 3 内部に、吸水されなかった回収液 3 が溜まり、ここに微生物または細胞が回収される。このとき、微生物または細胞の回収効率を向上させるために、回収液 3 中で吸水性樹脂粒子 1 5 を、ピペッティングを繰り返すこと等により、よく振とうさせることが好ましい。その後、キャップ 1 2 (図示せず) でチューブ本体 1 1 をキャップして、遠心分離する。本発明において、前記遠心分離の条件は、特に制限されず、例えば、500～13000Gで3秒～60分間、好ましくは1000～10000Gで10秒～10分間、より好ましくは5000Gで1分間である。遠心分離器も特に制限されず、例えば、卓上遠心分離器を使用してもよい。遠心分離後、図 2 (d) に示すように、遠心チューブの下部に回収液が溜まるので、これを回収して、後述の遺伝子検査の試料とする。

つぎに、本発明の遺伝子の增幅若しくは検出方法において、前記抽出試薬液は、前記微生物または細胞の収集方法における回収液として使用

することが好ましい。前記回収液が前記抽出試薬液であれば、これをそのまま加熱すれば遺伝子を抽出でき、前記抽出試薬液添加操作が省略できる。前記抽出試薬液の加熱温度は、特に制限されないが、70℃以上100℃未満が好ましい。加熱温度が、100℃未満であれば、突沸して試料が飛び散ることが無く、また温度コントロールが容易になって、特別の加熱器を必要としない等の利点がある。前記加熱温度は、より好ましくは80℃以上100℃未満であり、最適には96℃である。また、加熱時間は、例えば、1～30分間であり、好ましくは10分間である。前記液体のpHは、例えば、pH 7.0～12.0の範囲であり、好ましくはpH 8.0である。前記抽出試薬液中の前記非イオン界面活性剤の濃度は、例えば、0.01～10重量%であり、好ましくは0.5～2.0重量%であり、より好ましくは1.0重量%である。

前記非イオン界面活性剤としては、例えば、Span20、Span40、Span60、Span65、Span80、Span85等（以上、ナカライトスク社製等）のd-ソルビトールの脂肪酸エステル、Tween20、Tween21、Tween40、Tween60、Tween65、Tween80、Tween81、Tween85等（以上、ナカライトスク社製等）のポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル、TritonX-100等（以上、ナカライトスク社製等）のポリオキシエチレングリコールp-t-オクチルフェニルエーテル等がある。これらは、単独で使用してもよいし、2種類以上で併用してもよい。このなかで、Triton X-100、Tween20、Tween21が好ましく、より好ましいのはTritonX-100である。

本発明の遺伝子の增幅若しくは検出方法において、さらに、前記抽出試薬液は、金属キレート剤を含むことが好ましい。試料中には、DNA

s e 等の遺伝子分解酵素が含まれており、金属キレート剤は、これによる遺伝子の分解を防止する作用等を発揮する。前記抽出試薬液中の前記金属キレート剤の濃度は、例えば、0. 1～1 0 0 mMであり、好ましくは1. 0 mMである。前記金属キレート剤としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレングリコールーピス(β-アミノエチルエーテル)-N, N, N', N'-四酢酸(EGTA)、ジアミノシクロヘキサン四酢酸、O-フェナ NSロリン、サリチル酸等がある。これらは、単独で使用してもよいし、2種類以上で併用してもよい。このなかで、好ましいのは、EDTA、EGTAであり、より好ましいのは、EDTAである。

10

本発明の対象となる微生物は、特に制限されず、例えば、抗酸菌、非定型抗酸菌、淋菌、レジオネラ、マイコプラズマ、スピロヘータ、梅毒スピロヘーター、クラミジア、リケッチア、らい菌、鼠咬症スピリルム、ブドウ球菌、連鎖球菌、大腸菌、綠膿菌、ペスト菌、ウイルス、日本15 脳炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ATLV、HIVおよびエボラ出血熱ウイルス等がある。抗酸菌としては、例えば、鳥型結核菌(*M. avium*)、エム・イントラセルラレエ(*M. intracellulare*)、エム・ゴルドネエ(*M. gordonae*)、ヒト型結核菌(*M. tuberculosis*)、エム・カンサシイ(*M. kansasii*)、エム・フォルツイツム(*M. fortuitum*)、エム・ケロネエ(*M. chelonae*)、ウシ型結核菌(*M. bovis*)、エム・ス20 クロフラセウム(*M. scrofulaceum*)、パラ結核菌(*M. paratuberculosis*)、チモテ菌(*M. phlei*)、エム・マリヌム(*M. marinum*)、エム・シミエー(*M. simiae*)、エム・スクロフラセウム(*M. scrofulaceum*)、エム・スズルガイ(*M. szulgai*)、らい菌(*M. leprae*)、エム・キセノピ(*M. xenopi*)、エム・ウルセラ NS(*M. ulcerans*)、鼠らい菌(*M. lepraemurium*)、エム・フ25 ラベセンス(*M. flavescens*)、エム・テレエ(*M. terrae*)、エム・

ノンクロモジエニクム (*M. nonchromogenicum*)、エム・マルメンス (*M. m almoense*)、エム・アシアティクム (*M. asiaticum*)、エム・ヴァケエ (*M .vaccae*)、エム・ガストリ (*M. gastri*)、エム・トリビアル (*M. trivial e*)、エム・ヘモフィラム (*M. haemophilum*)、エム・アフリカヌム (*M. af 5 ricanum*)、エム・サーモレジスタブル (*M. thermoresistable*) およびス メグマ菌 (*M. smegmatis*) 等がある。また、本発明の対象となる細胞は、 特に制限されず、例えば、ヒト白血球、ヒト体細胞、その他動植物の細 胞等の遺伝物質を含む細胞組織系等がある。

10 本発明において、前記液状試料としては、例えば、痰、膿液、糞、唾 液、血液、組織、尿、これらの生体試料を前処理した試料等がある。前 記前処理試料としては、例えば、喀痰をN-アセチル-L-システィン (NALC) と水酸化ナトリウム (NaOH) で処理した試料がある。この他に 、本発明における前記液状試料としては、浴槽の水、プールの水、養魚 15 場の水、河川の水、湖水、海水などがある。

本発明の前記液状試料の量は、特に制限されないが、臨床検査のよう な比較的少ない量で良い場合は、例えば、 $5 \mu\text{L} \sim 10 \text{ mL}$ の範囲、好 ましくは $10 \mu\text{L} \sim 1 \text{ mL}$ 、より好ましくは $50 \mu\text{L} \sim 500 \mu\text{L}$ であ 20 り、浴槽の水や河川の水などの水質検査の一環として微生物等の濃度を 検査するような比較的大量の試料の場合、例えば、各省庁の省令で定め られた試料の量の範囲であり、具体的には、 $1 \text{ mL} \sim 10 \text{ L}$ の範囲、好 ましくは $10 \text{ mL} \sim 1 \text{ L}$ 、より好ましくは $50 \text{ mL} \sim 200 \text{ mL}$ である 。前記省令としては、例えば、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対 25 策マニュアル」(平成13年9月11日付け健衛発第95号厚生労働省健 康局生活衛生課長通知) があげられる。その中で、例えば、浴槽中のレ

ジオネラ属菌は10CFU/100mL未満を基準とすると定められており、浴槽中のレジオネラ属菌を検出する場合は、少なくとも100mLの試料を用いる必要がある。なお、これらの前記液状試料の量は、前述のように、前記吸水性樹脂の吸水量を超えないことが好ましい。

5

つぎに、本発明の遺伝子の増幅若しくは検出方法は、例えば、以下のようにして実施できる。すなわち、まず、前記所定pHの緩衝液に、必要に応じてEDTA等の金属キレート剤を添加し、さらに非イオン界面活性剤を添加して抽出試薬液を調製する。前記緩衝液としては、例えば、
10 Tris-HClバッファー、HEPESバッファー、MOPSバッファー、HEPPSバッファー、TAPSバッファー、リン酸バッファー等がある。この抽出試薬液は、オートクレイブにより高圧蒸気滅菌することが好ましい。他方、試料液を調製する。例えば、喀痰検体を、N-アセチル-L-システイン-NaOH法(NALC-NaOH法)等により、均質化および雑菌処理する。前記処理をした検体(液状試料)を、その内部に収集フィルターが配置され、この上に吸水性樹脂粒子が配置された遠心チューブ(例えば、図1に記載のもの)に添加し、さらに、前記抽出試薬液(回収液)を添加し、これを遠心分離(例えば、5000G、1分間)して、遠心チューブ下部に、前記抽出試薬液を溜める。この抽出試薬液を、そのまま、若しくは
15 別のチューブに移して、ヒートブロック等を用い、前記所定の温度で加熱することにより、抽出処理を行う。なお、加熱方法としては、前記ヒートブロックの他に、例えば、ウォーターバス、マイクロウェーブオープン、エアーバス等がある。このようにして抽出処理した検体は、そのまま、若しくは前処理を施して遺伝子増幅若しくは検出処理を行うことができる。
20 前記遺伝子増幅若しくは検出方法としては、例えば、PCR法、RT-PCR等のPCRの変法等がある。また、分析対象となる遺
25

伝子としては、DNA、RNAがある。なお、回収液と抽出試薬液が別の場合は、回収液に抽出試薬液を加えて抽出処理をする。

実施例

5 以下に示すようにして、培養結核菌株について、遺伝子検査を行った

。

(結核菌の調製)

臨床分離結核菌株を商品名マイコプロス（極東製薬工業社製）にて、M
10 cFarland #1 の濁度になるまで35℃で培養した。その後、0.067
Mリン酸 buffer (pH: 6.8) にて10倍希釈系列 (10⁰～10⁻¹⁰
倍希釈) を作製し、それを試料とした。

(集菌操作)

15 商品名アイソポアフィルター（孔径3μm, ミリポア社製）を備えた
フィルターユニット（図1参照）に、吸水性樹脂粒子（商品名アクアキ
ープ10SH P、住友精化社製）0.0065gを配置した遠心チュ
ーブ（図1参照）を準備した。この遠心チューブに、前記結核菌希釈試
料100μLを添加し、その後、さらに抽出試薬液を500μL添加し
た。この抽出試薬液は、回収液を兼ねるものであり、TE緩衝液（10
20 mMのEDTA、25mMのTris-HCl: pH 8.0）に1%の濃度でTrito
nX-100（ナカライ社製）を溶解し、オートクレイブしたものである。そ
の後、5000Gで1分間遠心分離し、遠心チューブ底に溜まったろ液
(約100μL) を回収した。

25

(遺伝子抽出)

前記ろ液をヒートブロックにて 96 ℃、10 分間加熱し、結核菌を溶菌した。

(PCRによる遺伝子の検出)

5 前記溶菌液 25 μL に、商品名アンプリコア増幅キット（日本ロシュ社製）の Master mixture 50 μL 及び 15 mM 酢酸マグネシウム 25 μL を添加し、PCR 反応を行った。反応条件および操作などは、前記キット添付文書どおりに行つた。遺伝子の検出は、商品名アンプリコア検出キット（日本ロシュ社製）を用いて行つた。この操作は前記キットの添付文書どおりに行つた。
10

(比較例 1)

比較例として、前記試料を、商品名アンプリコア前処理キット（日本ロシュ社製）を用いて処理し、これについて、上記と同じ PCR による遺伝子の検出を行つた。
15

(結果)

実施例 1 および比較例 1 において、検出感度は双方ともに 10⁵ 倍希釈まで陽性であり、それ以上は陰性であった。また、内部標準（IC）は双方ともすべて陽性であった。このことから、本発明の実施例と従来法である比較例とは、培養結核菌での集菌・溶菌効果は同等であるといえる。さらに、IC もすべて陽性であることから、PCR 阻害物質の混入も抑えられたことがわかった。さらに、本発明の実施例は、比較例に比べ、集菌および溶菌に費やす時間が約 5 分の 1 に短縮された。

25

(実施例 2)

結核（T B）の疑いのある患者からの喀痰検体（7 検体）について、N ALC-NaOH 処理し、これを試料とした。この試料を用い、実施例 1 と同様にして、集菌、遺伝子の抽出、PCR による遺伝子の検出を行った。この結果を、下記表 1 に示す。

5

(比較例 2)

実施例 2 と同じ試料について、商品名アンプリコア前処理キット（日本ロシュ社製）を用いて処理し、これについて、実施例 1 と同じ PCR による遺伝子の検出を行った。この結果を下記の表 1 に示す。

10

(表 1)

サンプル No.	実施例*	比較例*
1	1.786	2.796
2	2.809	2.662
15 3	2.875	2.85
4	2.668	2.8
5	2.772	2.816
6	2.752	2.741
7	2.728	2.736

20 * 吸光度（波長 450 nm）

前記表 1 に示すように、7 検体全てにおいて、実施例 2 および比較例 2 とも陽性となり、また内部標準（IC）も、前記実施例 2 および比較例 2 において、陽性であった。このことから、本発明の方法は、従来の方法と同様の性能であるといえる。また、本発明の方法は、従来の方法にくらべ、集菌操作および溶菌操作を簡単かつ迅速に実施可能である。

産業上の利用可能性

以上のように、本発明の収集方法は、特殊な装置を用いることなく、簡単かつ短時間に微生物または細胞を収集できる方法である。したがつ
5 て、本発明の方法を、遺伝子の増幅・検出法による微生物等の検査の試料の前処理に適用することにより、検査の高効率化を簡単に実現できる

請求の範囲

1. 液状試料から微生物または細胞を収集する方法であって、前記液状試料を吸水性樹脂に接触させることにより、前記吸水性樹脂に前記液状試料の液相部を吸収させ、かつ前記吸水性樹脂表面に前記微生物または細胞を捕獲して微生物または細胞を収集する方法。
5
2. 前記吸水性樹脂に前記液状試料を接触させた後、さらに、前記吸水性樹脂に回収液を接触させることにより、前記吸水性樹脂表面に捕獲
10された微生物または細胞を前記回収液中に回収する請求の範囲 1 記載の
方法。
3. フィルターで内部が上下に分けられ、かつ前記フィルター上に吸水性樹脂粒子が配置されている遠心チューブを準備し、この遠心チュ
15ブに前記液状試料を入れて前記吸水性樹脂粒子に接触させ、ついで前記
回収液を前記遠心チューブに入れて前記吸水性樹脂粒子に接触させ、遠
心分離により前記回収液を、前記フィルターを通過させて前記遠心チュ
ーブの底部に移動させる請求の範囲 2 記載の方法。
- 20 4. 前記遠心分離の条件が、500～13000Gで3秒～60分である請求の範囲 3 記載の方法。
5. 前記液状試料の添加量が、前記吸水性樹脂の吸水容量以下である
請求の範囲 1 から 4 のいずれかに記載の方法。
- 25 6. 前記回収液の添加量が、前記液状試料の液相部の吸収後における

前記吸水性樹脂の吸水可能容量を超えた量である請求の範囲 2 から 4 のいずれかに記載の方法。

7. 前記吸水性樹脂が、親水性官能基を有する親水性架橋重合体である請求の範囲 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

8. 収集の対象となる微生物が、抗酸菌、非定型抗酸菌、淋菌、レジオネラ、マイコプラズマ、スピロヘータ、梅毒スピロヘーター、クラミジア、リケッチア、らい菌、鼠咬症スピリルム、ブドウ球菌、連鎖球菌、大腸菌、綠膿菌、ペスト菌、ウイルス、日本脳炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ATLV、HIV およびエボラ出血熱ウイルスからなる群から選択される少なくとも一つである請求の範囲 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

15 9. 前記抗酸菌が、鳥型結核菌 (*M. avium*)、エム・イントラセルラレエ (*M. intracellulare*)、エム・ゴルドネエ (*M. gordonae*)、ヒト型結核菌 (*M. tuberculosis*)、エム・カンサシイ (*M. kansasii*)、エム・フォルツイツム (*M. fortuitum*)、エム・ケロネエ (*M. chelonae*)、ウシ型結核菌 (*M. bovis*)、エム・スクロフラセウム (*M. scrofulaceum*)、パラ結核菌 (*M. paratuberculosis*)、チモテ菌 (*M. phlei*)、エム・マリヌム (*M. marinum*)、エム・シミエー (*M. simiae*)、エム・スクロフラセウム (*M. scrofulaceum*)、エム・スズルガイ (*M. szulgai*)、らい菌 (*M. leprae*)、エム・キセノピ (*M. xenopi*)、エム・ウルセラヌス (*M. ulcerans*)、鼠らい菌 (*M. lepraeumurium*)、エム・フラベセンス (*M. flavescens*)、エム・テレエ (*M. terrae*)、エム・ノンクロモジエニクム (*M. nonchromogenicum*)、エム・マルメンス (*M. malmoense*)、エム・アシアティクム (*M. asiaticum*)、

エム・ヴァケエ (*M. vaccae*)、エム・ガストリ (*M. gastri*)、エム・トリビアル (*M. triviale*)、エム・ヘモフィラム (*M. haemophilum*)、エム・アフリカヌム (*M. africanum*)、エム・サーモレジスタブル (*M. thermoresistable*) およびスメグマ菌 (*M. smegmatis*) からなる群から選択される少なくとも一つである請求の範囲 8 記載の方法。

10. 前記液状試料が、痰、膿液、糞、唾液、血液、組織、スワブ、胃洗浄液、尿、これらの生体試料を前処理した試料、浴槽の水、プールの水、養魚場の水、河川の水、湖水および海水からなる群から選択される少なくとも一つである請求の範囲 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

11. 前記液状試料の量が、 $50 \mu\text{L} \sim 500 \mu\text{L}$ の範囲である請求項 1 記載の方法。

15. 12. 前記液状試料の量が、 $50 \text{ mL} \sim 200 \text{ mL}$ の範囲である請求項 1 記載の方法。

13. 請求の範囲 3 記載の方法に使用する微生物または細胞の収集用具であって、フィルターで内部が上下に分けられ、かつ前記フィルター上に吸水性樹脂粒子が配置されている遠心チューブを含む用具。

14. 微生物または細胞の遺伝子を特異的に増幅若しくは検出する方法であって、請求の範囲 1 から 12 のいずれかに記載の方法により微生物または細胞を収集し、これに非イオン性界面活性剤を含む抽出試薬液を添加して加熱することにより微生物または細胞から遺伝子を抽出し、この遺伝子を特異的に増幅もしくは検出する方法。

15. 前記抽出試薬液が、前記回収液を兼ねる請求の範囲 14 記載の方法。

5 16. 前記加熱温度が、70°C以上100°C未満である請求の範囲 14 または 15 記載の方法。

17. 前記加熱時間が、1～30分間である請求の範囲 14 から 16 のいずれかに記載の方法。

10

18. 前記加熱条件が、96°Cで10分間の条件である請求の範囲 14 または 15 記載の方法。

15 19. 前記抽出試薬液の pH が、pH 7.0～12.0 の範囲である請求の範囲 14 から 18 のいずれかに記載の方法。

20. 前記抽出試薬液中の前記非イオン界面活性剤の濃度が、0.0 1～10重量%の範囲である請求の範囲 14 から 19 のいずれかに記載の方法。

20

21. 非イオン界面活性剤が、d-ソルビトール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステルおよびポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテルからなる群から選択される少なくとも一つである請求の範囲 14 から 20 のいずれかに記載の方法。

22. さらに、前記抽出試薬液が、金属キレート剤を含む請求の範囲
14から21のいずれかに記載の方法。

23. 前記抽出試薬液中の前記金属キレート剤の濃度が、0.1～1
5 00 mMである請求の範囲24記載の方法。

24. 前記金属キレート剤が、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチ
レングリコールーピス(β-アミノエチルエーテル)-N,N,N',
N'-四酢酸(EGTA)、ジアミノシクロヘキサン四酢酸、o-フェナンス
10 ロリンおよびサリチル酸からなる群から選択された少なくとも一つであ
る請求の範囲22または23記載の方法。

25. 遺伝子の特異的な増幅もしくは検出方法が、ポリメラーゼチ
エーンリアクション(PCR)法である請求の範囲14から24のい
15 ずれかに記載の方法。

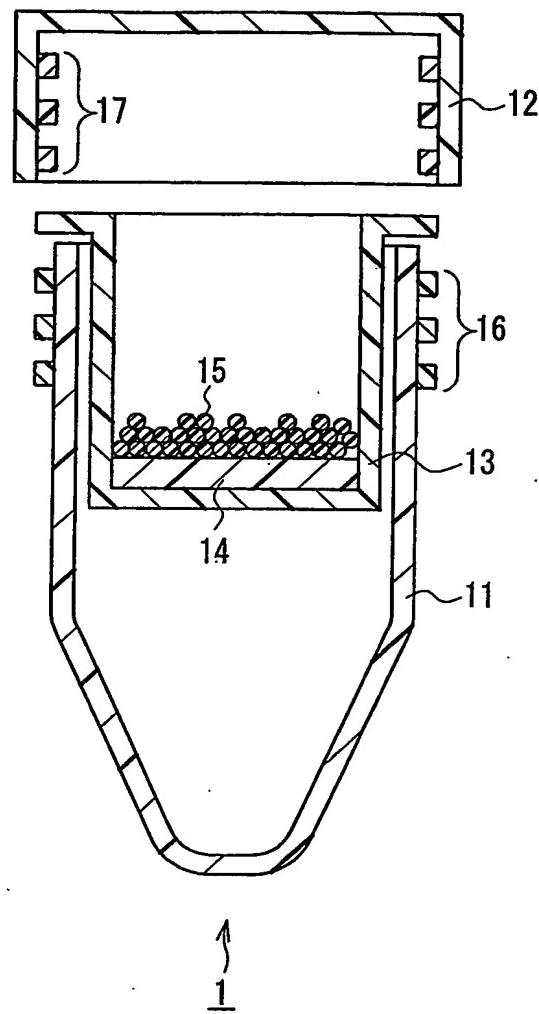


FIG. 1

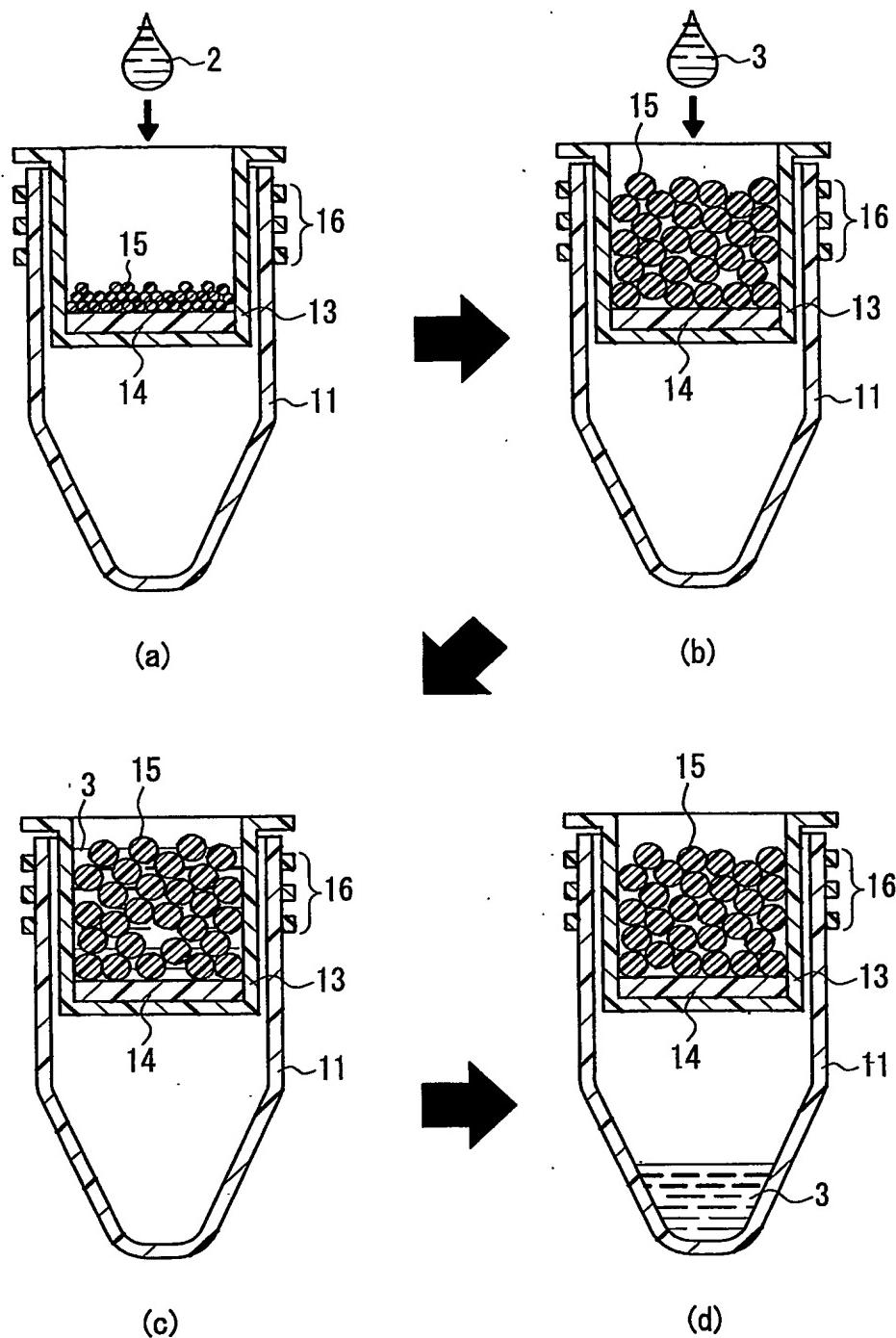


FIG. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15686

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N1/02, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N1/02, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-112497 A (NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 24 April, 2001 (24.04.01), (Family: none)	1-25
Y	JP 2000-14380 A (NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 18 January, 2000 (08.01.00), (Family: none)	1-25
Y	JP 49-41577 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 18 April, 1974 (18.04.74), (Family: none)	1-25
Y	JP 7-111887 A (Nippon Shokubai Co., Ltd.), 02 May, 1995 (02.05.95), (Family: none)	1-25

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 January, 2004 (14.01.04)Date of mailing of the international search report
27 January, 2004 (27.01.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP03/15686**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 7-1116679 A (Nippon Shokubai Co., Ltd.), 09 May, 1995 (09.05.95), (Family: none)	1-25

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/15686

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N1/02, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N1/02, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/WPI(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTPlus/JST7580(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-112497 A (日本製薬株式会社) 2001.04.24 (ファミリーなし)	1-25
Y	JP 2000-14380 A (日本製薬株式会社) 2000.01.18 (ファミリーなし)	1-25
Y	JP 49-41577 A (旭化成工業株式会社) 1974.04.18 (ファミリーなし)	1-25

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.01.2004

国際調査報告の発送日

27.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

七條 里美

4B 2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/15686

C(続き)	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	JP 7-111887 A (株式会社日本触媒) 1995.05.02 (ファミリーなし)	1-25
Y	JP 7-1116679 A (株式会社日本触媒) 1995.05.09 (ファミリーなし)	1-25